

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/090375 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07H 3/04**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002936

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. März 2005 (18.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 013 736.6 18. März 2004 (18.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BASF AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BOY, Matthias** [DE/DE]; Wormser Weg 1, 63225 Langen (DE). **POMPEJUS, Markus** [DE/KR]; 401, Bau Haus., 653-15 Hannam-dong., Yongsan-gu, 140-210 Seoul (KR). **KLEIN, Daniela** [DE/DE]; M 7, 2, 68161 Mannheim (DE). **VÖLKERT, Martin** [AT/DE]; Limburgstr. 5, 67063 Ludwigshafen (DE). **BROWN, James Reuben** [NZ/DE]; Jungbuschstr. 24, 68159 Mannheim (DE).

(74) Anwalt: **HÖRSCHLER, Wolfram, J.**; Patentanwälte Isenbruck, Bösl, Hörschler, Wichmann, Huhn, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING TREHALOSE WITH THE AID OF ALUMOSILICATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG VON TREHALOSE MIT HILFE VON ALUMOSILICATEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for enriching trehalose from solutions, wherein the enrichment is performed with the aid of an adsorbent. The invention is characterized in that the adsorbent is an aluminosilicate. The aluminosilicate is preferably a zeolite. The invention also relates to the enrichment and purification of trehalose from fermentation broths, more particularly as coupled product from the fermentative production of other value products.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen, bei welchem die Anreicherung mit Hilfe eines Adsorbens erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Aluminosilicat ist. Vorzugsweise ist das Aluminosilicat ein Zeolith. Ferner betrifft die Erfindung die Anreicherung und Reinigung von Trehalose aus Fermentationsbrühen, insbesondere als Koppelprodukt der fermentativen Herstellung anderer Wertprodukte.



**WO 2005/090375 A1**

---

**Verfahren zur Anreicherung von Trehalose mit Hilfe von Alumosilicaten**

---

- 5 Die folgende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen, bei welchem die Trehalose mit Hilfe eines Adsorbens angereichert wird.

Das Disaccharid Trehalose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid) besteht aus zwei Glucose-Molekülen, die über  $\alpha,\alpha$ -1,1-Bindung miteinander kovalent verknüpft sind. Trehalose ist aufgrund ihrer anwendungstechnisch interessanten Eigenschaften von zunehmender Bedeutung für die Industrie. Ein wichtiger Anwendungsbereich ist die Stabilisierung von Proteinen und Peptiden, beispielsweise von Enzymen und Impfstoffen. Bevorzugte Verwendung findet Trehalose in der Lebensmittelindustrie. Trehalose wird auch als Ersatzstoff für Saccharose aufgrund ihrer reduzierten Süße und ihrer geschmackskonservierenden Eigenschaften eingesetzt. Darüber hinaus wirkt Trehalose bei Gefrier- und Trocknungsvorgängen stabilisierend. Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt im Kosmetikbereich.

Die Herstellung von Trehalose erfolgt bevorzugt auf enzymatischem Wege oder durch Fermentation mit Hilfe geeigneter Mikroorganismen (Schiraldi, C., et al. (2002). Trehalose Production: Exploiting Novel Approaches. Trends in Biotechnology, vol. 20 (10), Seiten 420-425). Häufig entsteht Trehalose auch als Nebenprodukt bei Fermentationen, die der Herstellung anderer Substanzen dienen (Hull, S.R., Gray, J.S.S., et al. (1995). Trehalose as a Common Industrial Fermentation Byproduct. Carbohydrate Research, vol. 266, Seiten 147-152). Insbesondere bei Fermentationen entstehen, anders als bei chemischen Synthesen, starke verunreinigte Lösungen, die beispielsweise Zellen, Proteine, Lipide, oder andere Zucker enthalten können.

Die Trehalose muss also aus solchen stark verunreinigten Lösungen angereichert und, je nach Verwendungszweck, weiter gereinigt werden.

30 Im Stand der Technik sind verschiedene Anreicherungs- und Reinigungsverfahren für Trehalose bekannt.

35 US 5,759,610 beschreibt ein Verfahren zur Aufreinigung von Trehalose aus Kulturen von Mikroorganismen, umfassend die Schritte Filtration und Zentrifugation, Behandlung mit Aktivkohle, Deionisierung, Reinigung mit Ionenaustauschern, Konzentration zu sirupartigen Produkten, weitere Aufreinigung durch Säulenchromatographien wie Ionenaustauschersäulen-Chromatographie, Aktivkohle-Chromatographie und Silicagelsäulen-Chromatographie,

sowie Präzipitieren mit organischen Lösungsmitteln wie Alkohol und Aceton und Filtrieren über geeignete Membranen, und Fermentation durch Hefe oder alkalische Behandlung, um etwaige verbliebene Saccharide zu entfernen oder abzubauen. Für eine weitere Aufreinigung werden beispielsweise Kühlungskristallisation oder Sprühtrocknung vorgeschlagen. Eine  
5 Adsorption von Trehalose an ein Adsorbens erfolgt nicht.

JP 07000190 (Tadashi, W., et al.) beschreibt die Isolierung von Trehalose aus festen Rückständen von Brauerei-Fermentationen. Dabei wird der Rückstand mit Alkohol extrahiert und/oder mit Ultraschall behandelt, um die Trehalose aus dem Rückstand zu extrahieren.  
10 Ferner wird das im Rückstand vorhandene Enzym Trehalase durch Hitzebehandlung inaktiviert. Die Reinigung erfolgt unter anderem über Ionenaustauschersäulen und eine Aktivkohlesäule. Die Trehalose wird dabei an den Säulen nicht adsorbiert.

US 5,441,644 beschreibt ein Verfahren, bei welchem Trehalose aus einer Fermentationsbrühe gereinigt wird. In dem Verfahren erfolgt unter anderem eine Ultrafiltration und eine Entfärbung mit Hilfe von Aktivkohle. Die Trehalose wird dabei an der Aktivkohle nicht adsorbiert.  
15

Ein Nachteil der genannten Verfahren scheint zu sein, dass die jeweiligen Adsorbentien lediglich zur Adsorption der unerwünschten Fremdstoffe verwendet werden, nicht jedoch die Trehalose selbst adsorbieren. Da die Extraktions- und Reinigungsschritte an die unterschiedlichen Fremdstoffe angepasst sein müssen, sind sie kompliziert und im industriellen Maßstab nur schwierig anzuwenden. Insbesondere gilt dies für die Reinigung aus Fermentationsbrühen, in welchen der Gehalt an Trehalose gewöhnlich weniger als 15 % des Trockengewichtes beträgt (Schiraldi et al. (2002), Trehalose Production: Exploiting Novel Approaches. Trends in Biotechnology, vol. 20 (10), Seite 421).  
20  
25

Gemäß einem anderen Verfahren wurde Trehalose als Nebenprodukt einer Fermentation durch sequenzielle Chromatographie über Aktivkohle und Bio-Gel P-2 gereinigt (Hull, S.R., Gray, J.S.S., et al. (1995). Trehalose as a Common Industrial Fermentation Byproduct. Carbohydrate Research, vol. 266, Seiten 147-152). Bei dem Verfahren handelt es sich aber lediglich um ein Nachweisverfahren, nicht jedoch um ein Verfahren, das für die Anwendung im industriellen Maßstab geeignet ist.  
30

US 5,441,644 erwähnt neben dem oben beschriebenen Verfahren ein weiteres Verfahren aus dem Stand der Technik, bei welchem eine trehalosehaltige Acetonitril-Lösung einer Silica-  
35

gel-Chromatographie unterworfen wird. In der Schrift wird erwähnt, dass diese chromatographischen Verfahren für die Trehalose-Anreicherung oder -Reinigung im industriellen Maßstab jedoch nicht geeignet sind.

- 5 Buttersack et al. (Specific Adsorption from Aqueous Phase on Apolar Zeolites, Progress in Zeolite and Microporous Materials, vol. 105, p. 1723-1730, 1997) beschreiben die Bindung bestimmter Mono- und Disaccharide an ausgewählte FAU-, PEA-, und MFI-Zeolithe. Für einzelne Disaccharide wurden dabei sehr unterschiedliche Adsorptionseigenschaften gefunden. Trehalose wurde nicht untersucht.

10

In einer weiteren Arbeit beschreiben Buttersack et al. die Bindung von Disacchariden an unterschiedliche Y-Zeolithe und dealuminierte Y-Zeolithe (Buttersack et al. (1994). Adsorption of Glucose and Fructose containing Disaccharides on Different Faujasites. Studies in Surface Science and Catalysis, vol. 84, p. 1363-1371). Dabei betonten sie die Bedeutung des  
15 Fructose-Restes in den untersuchten Disacchariden für die Adsorption an die Zeolithe. Trehalose wurde nicht untersucht und weist auch keinen Fructose-Rest auf.

Ein Nachteil der bisherigen Adsorbentien ist, dass sie sehr allgemeine Adsorptionseigenschaften haben und nicht für das jeweilige Verfahren maßgeschneidert werden können.

20

Daher besteht Bedarf an Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen unter Verwendung besserer Adsorbentien, insbesondere an Adsorbentien, die sich auf das jeweilige Verfahren maßschneidern lassen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, ein solches Verfahren zur Verfügung zu stellen, insbesondere für den Einsatz in chromatographischen Verfahren. Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren  
25 zur Verfügung zu stellen, das eine Anreicherung von Trehalose aus Fermentationsbrühen, insbesondere aus Fermentationsbrühen aus der Lysin-Produktion, ermöglicht.

Die Lösung der Aufgabe geht aus von dem bekannten Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen mit Hilfe eines Adsorbens. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dann  
30 dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Alumosilicat ist.

Gegenüber den nach Stand der Technik verwendeten Adsorbentien (z.B. Aktivkohlen und Ionenaustauschern) bieten Alumosilicate, insbesondere Zeolithe, den Vorteil, dass eine größere Anzahl von Varianten hergestellt werden kann und dadurch das Adsorbens besser auf  
35 das Trennproblem maßgeschneidert werden kann.

- Trehalose kann durch eine Vielzahl von bekannten Verfahren hergestellt werden. Traditionell wird Trehalose durch fermentative Verfahren erzeugt, wobei mittlerweile auch enzymatische Produktionsverfahren etabliert sind (Schiraldi, C., et al. (2002) Trehalose Production: Exploiting Novel Approaches. Trend in Biotechnology, vol. 20 (10), p. 420-425). In Mikroorganismen wurden 3 enzymatische Haupttrouten zur Trehalose-Synthese entdeckt: (1) ein Phosphorylase-System in Pilzen und Hefe, (2) ein Glucosyltransferase-Hydrolase-System in mesophilen und extremophilen Bakterien und (3) eine Trehalose-Synthase-katalysierte Transglycosilierung von Maltose zu Trehalose (z.B. JP 09098779, KR99029104).
- 10 Der Begriff der Anreicherung ist dem Fachmann bekannt. Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff der Anreicherung insbesondere auf die Erhöhung des Anteils von Trehalose im Verhältnis zu unerwünschten Fremdstoffen. Typischerweise entspricht dies dem Anteil von Trehalose am Trockengewicht des Produktes.
- 15 In der bevorzugten Ausführungsform bezieht der Begriff der Anreicherung auch die Reinigung von Trehalose mit ein. Der Begriff der Reinigung ist dem Fachmann bekannt. Im vorliegenden Zusammenhang ist es insbesondere Ziel einer Reinigung, eine Reinheit von Trehalose zu erreichen, bei der Trehalose im Wesentlichen frei von anderen Substanzen ist. Insbesondere ist damit Trehalose in kristalliner Form gemeint.
- 20 Wirtschaftlich sinnvoll ist ein Anreicherungs- oder Reinigungsverfahren nur dann, wenn auch die Ausbeute befriedigend ist. Daher ist es ein weiteres Ziel des vorliegenden Verfahrens, sowohl eine hohe Anreicherung als auch eine hohe Ausbeute zu erreichen.
- 25 Im Hinblick auf die Lösung gibt es bezüglich der Lösungsmittel keine besonderen Einschränkungen, in Frage kommen beispielsweise Wasser oder Acetonitril. Vorzugsweise ist die Lösung eine wässrige Lösung.
- 30 Ein Adsorbens im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine feste oder gelartige Substanz, auf deren Oberfläche die Adsorption einer anderen Substanz stattfindet. Der Begriff der Oberfläche bezieht sich dabei auch auf die Innenfläche einer dreidimensionalen Matrix, beispielsweise die inneren Oberflächen des dreidimensionalen Gerüsts eines Zeoliths.
- 35 Beispiele für Adsorbentien im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Silicagel (Kieselgel), Aktivkohle und Alumosilicate.

Alumosilicate (Aluminosilicate) sind dem Fachmann bekannt. Der Begriff der Alumosilicate umfasst beispielsweise säureaktivierte Bentonite (Bleicherden) und Zeolithe.

Säureaktivierte Bentonite (Bleicherden) sind Bentonite, deren Smektite (quellfähige Tonminerale) durch Säurebehandlung partiell aufgelöst wurden und die somit eine hohe Oberfläche und ein großes Mikroporenvolumen aufweisen. Bentonite sind Tone, die durch die Verwitterung vulkanischer Asche (Tuffe) entstanden sind und aus den Mineralen Montmorillonit und Beidellite (Mineralgruppe der Smektite) bestehen.

Besonders bevorzugte Alumosilicate im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Zeolithe. In diesem Zusammenhang können auch solche Zeolithe unter die Erfindung fallen, die kein Aluminium enthalten.

Zeolithe sind eine weit verbreitete Gruppe von kristallinen Silicaten, und zwar von wasserhaltigen Alkali bzw. Erdalkali-Alumosilicaten der allgemeinen Formel  $M_{2/z}O \cdot Al_2O_3 \cdot x SiO_2 \cdot y H_2O$ , wobei M = 1- oder mehrwertiges Metall (meist ein Alkali oder Erdalkali-Kation) H oder  $NH_4$  u. a., z = Wertigkeit des Kations, x = 1,8 bis etwa 12 und y = 0 bis etwa 8. Das stöchiometrische Verhältnis von  $SiO_2$  zu  $Al_2O_3$  (Modul) ist eine wichtige Kenngröße der Zeolithe.

Die Kristallgitter der Zeolithe bauen sich aus  $SiO_4$ - und  $AlO_4$ -Tetraedern auf, die über Sauerstoffbrücken verknüpft sind. Dabei entsteht eine räumlich Anordnung gleich gebauter (Adsorptions-) Hohlräume, die über – untereinander gleich große – Porenöffnungen bzw. Kanäle zugänglich sind. Derartige Kristallgitter vermögen als Sieb zu wirken, welches Moleküle mit kleinerem Querschnitt als die Porenöffnungen in die Hohlräume des Gitters aufnimmt, während größere Moleküle nicht eindringen können. Zeolithe werden daher auch als Molekularsiebe bezeichnet. Für die Adsorption spielen auch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und andere zwischenmolekulare Kräfte eine Rolle. Viele chemische und physikalische Eigenschaften der Zeolithe sind abhängig vom Al-Gehalt.

Der Begriff der Zeolithe gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich sowohl auf natürliche als auch auf synthetische Zeolithe.

Die natürlich vorkommenden Zeolithe sind durch hydrothermale Umwandlung aus vulkanischen Gläsern bzw. Tuff-haltigen Ablagerungen entstanden. Nach ihren Kristallgittern lassen sich die natürlichen Zeolithe einteilen in Faser-Zeolithe (beispielsweise Mordenit,

MOR), Blätter-Zeolithe, und die so genannten Würfel-Zeolithe (beispielsweise Faujasit, FAU, und Offretit, OFF). Die unterschiedlichen Zeolithe werden üblicherweise mit Codes aus drei Buchstaben belegt (z.B. MOR, FAU, OFF).

- 5 Zur Herstellung der synthetischen Zeolithe geht man von  $\text{SiO}_2$ -haltigen (z.B. Wassergläser, Kieselsäure-Füllstoffe, Kieselsole) und von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -haltigen (z.B. Aluminiumhydroxide, Aluminate, Kaoline) Substanzen aus, die zusammen mit Alkalihydroxiden (meist NaOH) bei Temperaturen von über  $50^\circ$  in wässriger Phase zu den kristallinen Zeolithen umgesetzt werden.

10

Für den technischen Einsatz als Adsorptionsmittel können synthetische Zeolithe weiteren Modifizierungen unterworfen werden.

15

Vorzugsweise sollte der Zeolith eine Porengröße von mindestens  $7 \text{ \AA}$  aufweisen. Porengröße und Polarität des Zeoliths haben Einfluss auf das Verteilungsgewicht z.B. verschiedener Zucker, wodurch sich z.B. die Trenneigenschaft bei einer chromatographischen Verwendung ergibt. Aluminiumarme Zeolithe sind in der Regel polarer und damit vorrangig zur Adsorption von Zuckern geeignet.

20

Wie bereits beschrieben, können Zeolithe gut auf ein Trennproblem maßgeschneidert werden. Durch die primäre Herstellung kann die Porengröße beeinflusst werden, die Polarität ist dann über eine Nachbehandlung durch Reduzierung des Aluminiumgehaltes variierbar.

25

Bevorzugte Zeolithe gemäß der vorliegenden Erfindung sind FAU, BEA und OFF. Jeweils vorteilhafte Eigenschaften unterschiedlicher Zeolithe im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind aus Beispiel 1 ersichtlich. Besonders bevorzugt ist OFF.

30

Die Anreicherung mit Hilfe des Alumosilicates kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Das Alumosilicat kann entweder die unerwünschten Fremdstoffe adsorbieren, so dass die Trehalose in der Lösung verbleibt, oder es kann die Trehalose adsorbieren, so dass die unerwünschten Fremdstoffe in der Lösung verbleiben. In beiden Fällen ist es bevorzugt, wenn die Adsorption möglichst selektiv erfolgt.

35

Als Adsorber können Festbett-, Moving-bed- und Fluidized-bed-Adsorber zur Anwendung kommen. Die Adsorption kann batchweise oder kontinuierlich durchgeführt werden.

In der Ausführungsform, in der die Trehalose an das Alumosilicat adsorbiert wird, ergibt sich eine Reihe von Vorteilen. Die Zahl der notwendigen Aufarbeitungsschritte zur Isolierung von Trehalose wird durch selektive Anreicherung der Trehalose reduziert (im Gegensatz zu bisherigen Verfahren zur Isolierung von Trehalose, bei denen die häufig sehr unterschiedlichen unerwünschten Fremdstoffe Schritt für Schritt abgetrennt werden). Die Anzahl der Nebenprodukt-/Abfallströme wird im Vergleich zum schrittweisen Abtrennen der unerwünschten Fremdstoffe reduziert. Die Trehalose liegt aufgrund selektiver Adsorption bereits nach einem primären Anreicherungsschritt mit dem Alumosilicat in hoher Reinheit vor. Durch die verringerte Anzahl von Aufarbeitungsschritten und die reduzierte Anzahl von Nebenprodukt-/Abfallströmen werden die Herstellungskosten reduziert. Ferner kann auch vergleichsweise gering konzentrierte Trehalose durch selektive Anreicherung kostengünstig angereichert werden.

Bevorzugte Alumosilicate sind in dieser Ausführungsform daher Alumosilicate, insbesondere Zeolithe, an die Trehalose adsorbiert, vorzugsweise mit hoher Selektivität gegenüber in der Lösung vorhandenen unerwünschten Fremdstoffen binden.

Nach Adsorption der Trehalose an das Alumosilicat kann als weiterer Schritt die Trehalose vom Alumosilicat eluiert werden. Das Eluieren geschieht beispielsweise durch Elution mit Methanol, Ethanol, Wasser, heißem Wasser (50-100 °C), heißem Methanol (50-65 °C), heißem Ethanol (50-80 °C), oder anderen geeigneten Elutionsmitteln, beispielsweise Methylenchlorid, Acetonitril, NMP (N-Methyl-2-pyrrolidon), DMSO (Dimethylsulfoxid), niederkettige Ketone oder niederkettige Ether. Niederkettig bedeutet in diesem Zusammenhang eine Kettenlänge von bis zu C10, bevorzugt bis zu C6, besonders bevorzugt bis zu C4.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose, bei welchem das Adsorbens im Rahmen einer chromatographischen Auftrennung eingesetzt wird. Bei chromatographischen Verfahren kann die Trehalose über das unterschiedliche Laufzeitverhalten gegenüber anderen in der Lösung vorhandenen Substanzen abgetrennt werden. Dabei entstehen Fraktionen mit Eluaten, die die Trehalose enthalten.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff der Chromatographie alle bekannten und geeigneten chromatographischen Trennverfahren, beispielsweise Festbett-Chromatographie, moving bed-Chromatographie und simulated moving bed-Chromatographie. Die Chromatographie kann batchweise oder kontinuierlich durchgeführt werden. Eine kontinuierliche Chromatographie kann beispielsweise mit Hilfe eines Conti-



nuous Rotating Annular Chromatograph (CRAC), eines True Moving Bed Chromatograph (TMBC) oder in eines Simulated Moving Bed Chromatograph (SMB) durchgeführt werden.

5 Aus dem die Trehalose enthaltenden Eluat kann eine weitere Anreicherung oder Reinigung mittels weiterer geeigneter und dem Fachmann bekannter Verfahren erfolgen.

Beispielsweise kann eine weitere Anreicherung oder Reinigung von Trehalose durch Fällung erfolgen. Dabei können entweder gewünschte Wertstoffe oder unerwünschte Fremd-  
10 stoffe ausgefällt werden. Die Fällung kann unter anderem durch Zugabe eines weiteren Lösungsmittels, Zugabe von Salzen oder die Variation der Temperatur eingeleitet werden. Der entstehende Niederschlag von Feststoffen kann durch dem Fachmann bekannte Verfahren abgetrennt werden.

Beispielsweise können Feststoffe durch Filtration, wie Druck- und Vakuumfiltration, ab-  
15 trennt werden. Möglich sind beispielsweise Kuchen-, Tiefen- und Cross-flow-Filtrationen. Bevorzugt wird die Cross-flow-Filtration. Besonders bevorzugt wird dabei die Mikrofiltration zur Abtrennung von Feststoffen  $> 0,1 \mu\text{m}$ .

Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung von Feststoffen besteht in Sedimentation  
20 und/oder Zentrifugation. Zur Zentrifugation können verschiedenartige Bauformen eingesetzt werden, beispielsweise Röhren- und Korbzentrifugen, im speziellen Schub-, Stülpfilterzentrifugen und Tellerseparatoren.

Als weiterer Anreicherungs- oder Reinigungsschritt kann eine Behandlung mit Aktivkohle  
25 oder mit Ionenaustauschern (Anionenaustauschern und/oder Kationenaustauschern) durchgeführt werden. Solche Verfahrensschritte sind aus dem Stand der Technik bekannt (siehe beispielsweise US 5,441,644, US 5,858,735, und EP 0 555 540 A1).

Weitere Möglichkeiten zur Anreicherung, insbesondere zur Reinigung, bestehen in der An-  
30 wendung von Mikro- und Ultrafiltration (beispielsweise als Kuchen-, Tiefen- und Cross-flow-Filtrationen) sowie in der Reversosmose. Dabei können u.a. mikroporöse, homogene, asymmetrische und elektrisch geladene Membranen eingesetzt werden, die nach bekannten Verfahren erzeugt werden. Typische Werkstoffe für Membranen sind Celluloseester, Nylon, Polyvinylchlorid, Acrylnitril, Polypropylen, Polycarbonat und Keramik.

35

Der Einsatz der Membranen kann beispielsweise als Plattenmodul, Spiralmodul, Rohrbündel und Hohlfasermodule erfolgen. Daneben ist die Verwendung flüssiger Membranen mög-

lich. Die Trehalose kann sowohl feedseitig angereichert und über den Retentatstrom abgeführt als auch feedseitig abgereichert und über den Filtrat-/Permeatstrom abgeführt werden.

5 Zur weiteren Anreicherung von Trehalose, insbesondere der Reinigung und Konfektionierung, können verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden eingesetzt werden.

Ein bevorzugtes Verfahren ist dabei die Kristallisation. Kristallisation kann beispielsweise durch Kühlung, Verdampfung, Vakuumkristallisation (adiabate Kühlung), Reaktionskristallisation und Aussalzen erreicht werden. Die Kristallisation kann z.B. in gerührten und unge-  
10 rührten Kesseln, im Direkt-Kontakt-Verfahren, in Verdampfungskristallisatoren, in Vakuumkristallisatoren absatzweise oder kontinuierlich z.B. in Zwangsumlauf-Kristallisatoren (Swenson forced-circulation crystaller) oder Wirbelschicht-Kristallisatoren (Oslo-type). Auch fraktionierte Kristallisation ist möglich.

15 Die Kristallisation von Trehalose ist dem Fachmann grundsätzlich vertraut und ist, einschließlich der Kristallisation aus wässrigen Lösungen, ausführlich beschrieben worden (siehe auch Spalten 4 und 5 in US 5,441,644). So kann die Kristallisation beispielsweise durch vorherige Ultrafiltration erleichtert werden.

20 Eine besonders typische Methode zur Kristallisation von Trehalose ist die Kühlungskristallisation aus geeigneten Lösungsmitteln, beispielsweise Ethanol, Methanol, Wasser, Methylenchlorid, Acetonitril, NMP, DMSO, niederkettige Ketone oder niederkettige Ether. Niederkettig bedeutet in diesem Zusammenhang eine Kettenlänge von bis zu C10, bevorzugt bis zu C6, besonders bevorzugt bis zu C4.

25

Eine andere Kristallisationsmethode ist die Fällungskristallisation. Dabei liegt die Trehalose beispielsweise in Wasser vor und wird dann durch Zugabe eines Lösungsmittels geringerer Löslichkeit, beispielsweise eines niederkettigen Alkohols oder eines niederkettigen Ketons, ausgefällt. Niederkettig bedeutet in diesem Zusammenhang eine Kettenlänge von bis zu  
30 C10, bevorzugt bis zu C6, besonders bevorzugt bis zu C4.

Die Kristallisation kann durch Zugabe geringer Mengen von Trehalose-Kristallen beschleunigt werden, wobei die Trehalose-Kristalle als Kristallisationskeime dienen.

35 Weitere Verfahren zur weiteren Anreicherung von Trehalose, insbesondere zur Reinigung und Konfektionierung, ist die Trocknung. Es existieren Verfahren zur Konvektionstrocknung wie z.B. Trockenöfen, Tunneltrockner, Bandtrockner, Scheibentrockner, Jettrockner,

Wirbelschichttrockner, belüftete sowie rotierende Trommeltrockner, und Sprühtrocknung. Ein bevorzugtes Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Sprühtrocknung. Weitere Verfahren nutzen die Kontakttrocknung, wie z.B. Schaufeltrockner. Ebenso kann Wärmestrahlung (Infrarot) wie auch dielektrische Energie (Mikrowellen) zur Trocknung  
5 genutzt werden. Einen weiteren Bereich stellt die Vakuum- bzw. Gefriertrocknung dar. Möglich ist auch die Eindampfung, d.h. eine Trocknung, die zu einer Anreicherung, aber nicht notwendigerweise bis zur Trockne führt.

Ein weiteres Verfahren zur weiteren Anreicherung von Trehalose, insbesondere zur Reini-  
10 gung und Konfektionierung, ist die Nanofiltration. Dabei wird die Trehalose ganz oder teilweise auf der Retentatseite zurückgehalten und damit angereichert.

Es ist für den Fachmann ersichtlich, dass die genannten weiteren Anreicherungsschritte sowohl vor als auch nach der erfindungsgemäßen Behandlung mit dem Alumosilicat erfolgen  
15 können.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen, die der enzymatischen Trehalose-Synthese entstammen. Enzymatische Trehalose-Synthese ist dem Fachmann bekannt (siehe beispielsweise Schiraldi et al. (2002), Trehalose Production: Exploiting Novel Approaches. Trends in  
20 Biotechnology, vol. 20 (10), Seite 421-425, sowie US 5,919,668 und EP 0 990 704 A2).

In einer weiteren Ausführungsform sind die Lösungen Fermentationsbrühen.

25 Fermentationsbrühen im Sinne der vorliegenden Erfindung entstehen bei der Kultur von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen, insbesondere von Mikroorganismen (beispielsweise Bakterien, Hefen oder andere Pilze).

Bevorzugte Mikroorganismen bei der Synthese von Trehalose sind *Saccharomyces spec.*, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*; *Bacillus spec.*; *Candida spec.*, insbesondere *Candida fermentii*; *Escherichia coli*; *Corynebacterium spec.*, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoacidofirum* (z.B. ATCC 13870), *Corynebacterium lilium* (z.B. ATCC 15990) und *Corynebacterium melaseccola* (z.B. ATCC 17965); *Pseudomonas spec.*; *Nocardia spec.*; *Brevibacterium spec.*, insbesondere *Brevibacterium lactofermentum*  
30 (z.B. ATCC 13869), *Brevibacterium flavum* (z.B. ATCC 14067), und *Brevibacterium divaricatum* (z.B. ATCC 21642); *Arthrobacter spec.*, insbesondere *Arthrobacter sulfureis* (z.B. ATCC 15170), *Arthrobacter citoreus* (z.B. ATCC 11624); *Aspergillus spec.*; *Streptomyces*

spec.; *Microbacterium* spec., insbesondere *Microbacterium ammoniaphylum* (z.B. ATCC 15354); *Pichia* spec.; *Filobasidium* spec., insbesondere *Filobasidium floriforme*.

Weitere geeignete Mikroorganismen sind dem Fachmann bekannt, siehe beispielsweise  
5 Miyazaki, J.-I., et al. (1996)., Trehalose accumulation by a basidiomycotinous yeast, *Filobasidium floriforme*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 81 (4), Seiten 315-319.

Varianten dieser Stämme, die durch Mutation oder gentechnische Modifikation abgeleitet  
10 sind, oder die eine verstärkte Trehalose-Synthesefähigkeit haben, sind auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzbar.

Die Kultur der Mikroorganismen kann auch unter Zugabe geeigneter Antibiotika erfolgen, beispielsweise zum Induzieren der Trehalose-Synthese durch Zugabe eines  $\beta$ -Lactam-Ring-  
15 Antibiotikums.

Die Fermentationsbrühe enthält dabei zunächst sowohl die Zellen, als auch das Kulturmedium. Je nach Art der Fermentation kann ein signifikanter Teil der Trehalose intrazellulär akkumulieren. In diesem Fall ist es sinnvoll, die verwendeten Zellen aufzuschließen und die  
20 Trehalose mit geeigneten Verfahren zu extrahieren. Geeignete Verfahren, beispielsweise Ultraschall-Behandlung, Behandlung mit Detergentien, alkalische Lyse, und/oder Extraktion mit Alkohol oder Trichloressigsäure sind dem Fachmann bekannt (JP 07 000 190, US 5,441,644)

25 In den Fermentationsbrühen finden sich in der Regel erhebliche Mengen an Feststoffen, die vorzugsweise zunächst abgetrennt werden sollten.

Der Begriff der Feststoffe umfasst im vorliegenden Zusammenhang auch Zellen und zelluläre Bestandteile wie Nukleinsäuren und Proteine. Zur Abtrennung von Feststoffen, insbesondere von zellulären Bestandteilen, ist es vorteilhaft, diese zunächst zu agglomerieren. Das  
30 kann mit beliebigen geeigneten Verfahren erfolgen, allerdings sollte dabei ein Abbau der Trehalose (beispielsweise durch Hydrolyse) weitgehend vermieden werden. Geeignete Methoden umfassen beispielsweise Alkali-Behandlung, beispielsweise  $\text{Ca(OH)}_2$ -Behandlung, oder Erhitzen. Vorteilhafterweise werden dabei auch möglicherweise vorhandene Enzyme  
35 mit Trehalase-Aktivität inaktiviert.

Die Abtrennung der Feststoffe kann dann mit dem Fachmann bekannten geeigneten Verfahren erfolgen. Beispiele für solche Verfahren wurden bereits oben genannt.

5 Das vorliegende Verfahren ist auch geeignet, Trehalose aus Lösungen, insbesondere Fermentationsbrühen, anzureichern, in denen Trehalose in geringen Konzentrationen vorliegt, insbesondere weniger als 15 Gewichtsprozent gemessen am Trockengewicht der Fermentationsbrühe.

10 Typischerweise beträgt die Konzentration von Trehalose zwischen 3 und 8 Gew.-% gemessen am Trockengewicht der Fermentationsbrühe. Nach Abtrennung eines anderen Wertproduktes, beispielsweise Lysin, kann der Massenanteil der Trehalose auf 10-20 Gew.-% gemessen am Trockengewicht der verbleibenden Fermentationsbrühe steigen. Geht man auch von einer Abtrennung der Biomasse als unlösliche Bestandteile aus, dann beträgt die Konzentration der Trehalose 20-40 Gew.-% gemessen am Trockengewicht der Fermentationsbrühe.  
15

Daher betrifft eine weitere Ausführungsform der Erfindung auch ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Fermentationsbrühen in denen Trehalose in einer Konzentration weniger als 15 Gewichtsprozent gemessen am Trockengewicht der Fermentationsbrühe vorliegt.  
20

Bei vielen Fermentationen entstehen mehrere Wertprodukte. Häufig entsteht auch Trehalose als weiteres Wertprodukt. Ein Problem liegt jedoch darin, dass Anreicherungs- oder Reinigungsverfahren für fermentativ hergestellte Substanzen speziell an das jeweilige Wertprodukt angepasst ist (wie beispielsweise Reinigung über Ionenaustauscherchromatographie bei Aminosäuren oder organischen Säuren), Nach der Anreicherung des ersten Wertproduktes liegen andere Wertprodukte wie Trehalose nämlich in einer Umgebung vor, die die Anreicherung der weiteren Wertprodukte erschwert. Ein Beispiel sind hohe Ionenkonzentrationen nach Elution von Aminosäuren von Ionenaustauschermatrices). Das ist im Fall von Trehalose besonders problematisch, da Trehalose keine speziellen chemischen Eigenschaften hat (wie beispielsweise geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen oder elektrische Ladung), die sich zu einer einfachen Anreicherung eignen. Daher wird die Trehalose häufig mit dem Abfallstrom aus der Fermentation entsorgt.  
25  
30

35 Es ist daher eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Trehalose als weiteres Wertprodukt aus Fermentationsbrühen aufzuarbeiten, aus denen vorher oder nachher ein erstes Wertprodukt aufgearbeitet wurde oder wird.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher ein Verfahren zur Anreicherung von Trehalose als einem weiterem Wertprodukt aus Fermentationsbrühen, aus denen mindestens ein erstes Wertprodukt gewonnen wurde oder wird, enthaltend die Schritte Abtrennen von Feststoffen und Anreicherung der Trehalose mit Hilfe eines Adsorbens, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Alumosilicat ist.

Das vorliegende Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass es gegenüber den Eigenschaften der Lösung, in der die Trehalose vorliegt, in besonderem Maße tolerant ist. Daher kann das erfindungsgemäße Verfahren auch eingesetzt werden, wenn die Trehalose in einer Umgebung vorliegt, die die Anreicherung normalerweise erschweren würde.

Umgekehrt wird die Lösung, in der die Trehalose vorliegt, mit dem vorliegenden Verfahren besonders schonend behandelt, so dass auch nach der Anreicherung der Trehalose ein weiteres Wertprodukt gewonnen werden kann.

Daher kann die Gewinnung der Trehalose vor, nach, oder gleichzeitig mit dem ersten Wertprodukt geschehen.

Wertprodukte im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen beispielsweise organische Säuren, proteinogene und nicht proteinogene Aminosäuren, Nucleotide und Nucleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Co-Faktoren, Speicherstoffe wie beispielsweise PHA (Polyhydroxyalkanoate) oder PHB (Polyhydroxybutyrate), sowie Proteine und Peptide (beispielsweise Enzyme).

Ein bevorzugtes erstes Wertprodukt gemäß der vorliegenden Erfindung ist die Aminosäure Lysin.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf die von Alumosilicaten, insbesondere Zeolithen, in einem der Verfahren, die in dieser Beschreibung oder den Ausführungsbeispielen genannt sind.

In den Ausführungsbeispielen werden weitere Verfahren gezeigt, die geeignet sind, Trehalose aus Fermentationsbrühen aufzureinigen, aus welchen vorher ein anderes Wertprodukt gewonnen wurde.

Die Zeichnungen und Beispiele dienen der näheren Illustration der Erfindung.

Die anliegenden Zeichnungen zeigen in

Fig. 1 die Selektivität (s) von Zeolithen für Saccharose (sac) und Maltose (malt) relativ zu Trehalose (tre).

Fig. 2 die Selektivität (s) für Saccharose (sac) und Maltose (malt) relativ zu Trehalose, in Bezug zur Porengröße (p) ausgewählter Zeolithe

Bestimmung der Porengröße: Raumfüllende atomzentrierte Kugeln werden verwendet, um die van der Waals-Volumina für die Atome darzustellen, wobei die Radien der Kugeln den van der Waals-Radien entsprechen, wie sie im MSI Program Materials Studio definiert sind. Ein Vergrößerungsfaktor von 0,9 wird auf die van der Waals-Radien der Atome in der Zeolith-Pore angewendet und ein Helium Atom wird dann im Zentrum der Pore platziert. Der Vergrößerungsfaktor für den Helium van der Waals-Radius wird von Hand optimiert, bis das vergrößerte raumfüllende Volumen des Helium-Atoms mit den raumfüllenden Volumina der Zeolith-Pore in Kontakt kommt. Dieser Helium-Vergrößerungsfaktor wird als Vergrößerungsfaktor der Pore (Porengröße) verwendet.

Fig. 3 die Selektivität (s) für Kohlenwasserstoffe in Bezug zur Porengröße (p) ausgewählter Zeolithe

### **Beispiel 1**

Um die Diffusion von Zuckern in verschiedenen Zeolithen quantitativ zu vergleichen, werden theoretische Berechnungen durchgeführt. Dabei werden konventionelle molekulardynamische Simulationen entlang einer Diffusionskoordinate durchgeführt. Dabei wird die Diffusionskoordinate durch eine kleine treibende Kraft bestimmt, die entlang der Achse der weitesten Pore beziehungsweise des weitesten Kanals angelegt wird. Dies simuliert den Effekt eines Konzentrationsgradienten.

Zunächst wird untersucht, ob die Simulation qualitativ richtige Ergebnisse liefert. Dazu werden die errechneten Diffusionszeiten für Maltose und Saccharose in FAU und BEA mit experimentellen Messungen verglichen. Gemäß den Berechnungen diffundiert Maltose deutlich langsamer als Trehalose und Saccharose durch FAU (siehe Tabelle 1). Dies ist in

Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, die zeigen, dass Maltose eine deutlich niedrigere Adsorptionsfähigkeit hat als Saccharose.

Für BEA wird errechnet, dass Saccharose im Rahmen der verwendeten Zeitskala überhaupt nicht durch den Zeolithen wandert (siehe Tabelle 2). Dieser Effekt (keine Adsorption) ist ein allgemeines Kennzeichen für andere 1-2 Fru-Disaccharide, die experimentell gemessen wurden. Aus diesen Ergebnissen für BEA und FAU wird geschlossen, dass die Berechnung qualitativ korrekte Vorhersagen für die relative „Löslichkeit“ von Maltose und Saccharose in FAU und BEA liefert.

Zunächst wird eine Liste von Kandidaten für geeignete Zeolithen zur Trennung von Trehalose, von Maltose und Saccharose gebildet (Tabelle 1).

Tabelle 1:

	Tatsächliche Zusammensetzung	Berechnete Zusammensetzung
<b>DON</b>	$[\text{Si}_{64}\text{O}_{128}].2(\text{Cp}^*)_2 \text{CoF}_{0.75}(\text{OH})_{0.25}$	$\text{Si}_{64}\text{O}_{128}$
<b>EMT</b>	$\text{Na}_{21}(18\text{-crown-6})_n[\text{Al}_{21}\text{Si}_{75}\text{O}_{192}]$	$\text{Al}_{21}\text{Si}_{75}\text{O}_{192}$
<b>CFI</b>	$[\text{Si}_{32}\text{O}_{64}]$	$\text{Si}_{32}\text{O}_{64}$
<b>MOR</b>	$\text{Na}_8[\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}].24\text{H}_2\text{O}$	$\text{Si}_{40}\text{O}_{96}$
<b>MAZ</b>	$(\text{Na}_2, \text{K}_2, \text{Ca}, \text{Mg})_5[\text{Al}_{10}\text{Si}_{26}\text{O}_{72}].28\text{H}_2\text{O}$	$\text{Al}_{10}\text{Si}_{26}\text{O}_{72}$
<b>OFF</b>	$(\text{Ca}, \text{Mg})_{1.5}\text{K}[\text{Al}_4\text{Si}_{14}\text{O}_{36}].14\text{H}_2\text{O}$	$\text{Si}_{18}\text{O}_{36}$
<b>FAU</b>	$(\text{Na}_2, \text{Ca}, \text{Mg})_{29}[\text{Al}_{58}\text{Si}_{134}\text{O}_{384}].240 \text{H}_2\text{O}$	$\text{Al}_{96}\text{Si}_{96}\text{O}_{384}$
<b>BEA</b>	$\text{Na}_n[\text{Al}_n\text{Si}_{64-n}\text{O}_{128}]$	$\text{Si}_{64}\text{O}_{128}$

Molekulardynamische Simulationen werden dann mit diesen Zeolithen für alle 3 Zucker durchgeführt. Auf diese Weise kann die relative Selektivität der Zucker im Hinblick auf die Diffusion durch die entsprechenden Kanäle berechnet werden.

Die molekulardynamischen Kraftfeldsimulationen werden in einem mikrokkanonischen Ensemble bei 298 K durchgeführt. Die relativen Zeiten werden für Moleküle gemessen, die durch eine elektrostatische Kraft durch eine Pore in der Zeolithenstruktur getrieben werden. Die Kraft wird dadurch generiert, dass die Koordinaten eines geladenen Heliumatoms auf der gegenüberliegenden Seite der Pore des Moleküls fixiert werden, wobei das Molekül dann gleichmäßig auf jedem Atom mit einer entsprechenden Gegenladung beladen wird. Zum Beispiel wird den 5 Atomen der Trehalose, die dem Helium am nächsten sind, jeweils eine Ladung von -0,3 q zugeordnet, während das Heliumatom eine Ladung von +1,5 q hat.



Die verbleibenden Atome in dem System sind ungeladen. Die Selektivität in Fig. 1 wird gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Selektivität} = \frac{t_{\text{Trehalose}}}{t_{\text{Zucker}}}, \text{ wobei } t_{\text{Zucker}} = 8000 \text{ ps, wenn } t_{\text{Zucker}} > 8000 \text{ ps}$$

5

Die errechneten Diffusionszeiten für die Zucker sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2:

	Trehalose	Saccharose	Maltose
<b>FAU</b>	1500	2400	8000
<b>BEA</b>	1500	8000	3900
<b>DON</b>	2400	4400	2700
<b>EMT</b>	5100	4500	3000
<b>CFI</b>	1700	1200	1200
<b>MOR</b>	2400	1600	1950
<b>MAZ</b>	1800	1700	1800
<b>OFF</b>	2000	8000	8000

10

Eine graphische Darstellung der Selektivität ist in Fig. 1 dargestellt. Aus Fig. 1 wird deutlich, dass die einzelnen Zeolithe unterschiedliche Fähigkeiten haben, Trehalose aus einer Mischung von Zuckern zu trennen. Am vielseitigsten scheint OFF (Offretit) zu sein, welches kein Aluminium enthält und Trehalose deutlich gegenüber den anderen beiden Zuckern bevorzugt. FAU und BEA zeigen ebenfalls eine hohe relative Selektivität für Trehalose, zeigen aber auch eine gewisse Selektivität für Saccharose und Maltose.

15

### Beispiel 2

Anreicherung von Trehalose durch Fällung mit Calciumhydroxid, Zentrifugation anschließender Aktivkohlebehandlung und Trocknung des Rückstandes

20

1 L Lysin-Fermentationsbrühe werden nach Abtrennung des Lysins auf einem Ionentauscher mit 250 g festem Calciumhydroxid versetzt. Nach 4-stündigem Rühren wird die Suspension in einer Laborzentrifuge 10 min mit 3000 g zentrifugiert. Durch dieses Vorgehen werden aus der tiefbraunen Fermentationsbrühe 800 mL eines gelblich gefärbten Überstands gewonnen, der 7,6 g der ursprünglich eingesetzten 8 g Trehalose enthält. Zur weiteren Reinigung dieses Überstandes werden 400 g pulverisierte Aktivkohle zugegeben. Nach 12-

25

stündiger Inkubation bei RT wird die Aktivkohle über einen Faltenfilter abgetrennt. Dabei werden 650 mL eines leicht gelblichen Filtrats gewonnen, welches insgesamt 6,3 g Trehalose enthält. Abschließend wird das Filtrat gefriergetrocknet. Der verbliebende Rückstand von 9,7 g hat einen Trehalosegehalt von 64,9 Gew%.

5

**Beispiel 3**

Anreicherung von Trehalose durch Fällung mit Calciumhydroxid, Filtration, anschließender Aktivkohlebehandlung und Trocknung des Rückstandes

10

Im Gegensatz zu Beispiel 2 werden nach der Calciumhydroxidfällung die gebildeten Feststoffe durch Filtration abgetrennt. Dadurch werden 730 mL eines gelblich gefärbten Filtrates gewonnen. Das weitere Vorgehen erfolgt analog zu Beispiel 2, wodurch 8,7 g Trockenrückstand mit 66,2 Gew% Trehalosegehalt gewonnen werden können.

15

**Beispiel 4**

Anreicherung von Trehalose durch thermisch induzierte Fällung, Cross-Flow-Filtration, anschließende Aktivkohlebehandlung und Trocknung des Rückstandes

**Beispiel 5**

Anreicherung von Trehalose durch Fällung mit Calciumhydroxid, Zentrifugation anschließender Aktivkohlebehandlung und Trocknung des Rückstandes (Brühe aus neuer Aufarbeitung)

25 1 L Lysin-Fermentationsbrühe werden nach Abtrennung des Lysins auf einem Ionentauscher (Trehalosegehalt: 11 g/L) mit 100 g festem Calciumhydroxid versetzt. Nach 4-stündigem Rühren wird die Suspension in einer Laborzentrifuge 10 min mit 3000 g zentrifugiert. Zu den hierdurch erhaltenen 800 mL eines dunkelbraun gefärbten Überstands werden 20 g Aktivkohle gegeben und 19 h bei RT inkubiert. Die Aktivkohle wird durch Filtra-  
30 tion abgetrennt. Das Filtrat enthält 8.9 g Trehalose. Durch Eindampfen im Vakuum werden 72.6 g eines dunkelbraunen, klebrigen Rückstands mit einem Trehalosegehalt von 10.4 Gew.-% erhalten.

**Beispiel 6**

35 Anreicherung von Trehalose durch Adsorption auf Aktivkohle und Desorption mit Methanol

100 mL einer Trehalose enthaltenden Fermentationsbrühe (Gehalt 9.76 g/L) werden mit 10 g Aktivkohle (CPG 12x40) 16 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen über eine Schlitzsiebnutsche wird die Aktivkohle mit 100 mL Methanol 60 h bei RT geschüttelt. Nach erneutem Abfiltrieren wird das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der braune Rückstand von 1.1 g enthält 300 mg Trehalose (27 Gew.-%).

### **Beispiel 7**

Anreicherung von Trehalose durch Adsorption auf Aktivkohle und Desorption mit Ethanol unter Kühlungskristallisation

300 mL einer Trehaloselösung (Gehalt 9.25 g/L) werden mit 20 g Aktivkohle 18 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen über eine Schlitzsiebnutsche wird die Aktivkohle mit 300 mL Ethanol versetzt und 15 h unter Rückfluß gerührt. Die Aktivkohle wird heiß abfiltriert und das Filtrat auf 0-5 °C abgekühlt, wobei die Trehalose auskristallisiert. Nach Absaugen werden 1.3 g Trehalose als leicht graue Kristalle erhalten, das Filtrat wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und enthält 0.1 g Trehalose als weiße Kristalle.

Die Aktivkohle wird nach der Filtration 16 h bei RT mit 300 mL MeOH geschüttelt, abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt, dadurch werden weitere 0.5 g Trehalose als fast weiße Kristalle erhalten.

### **Beispiel 8**

Anreicherung von Trehalose durch Adsorption auf Kieselgel und Desorption mit Methanol

100 mL einer Trehalose enthaltenden Fermentationsbrühe (Gehalt 14 g/L) werden mit 10 g Kieselgel (MR3482) 19 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen über eine Glasfilternutsche wird das Kieselgel mit 100 mL Methanol 16 h bei RT geschüttelt. Nach erneutem Abfiltrieren wird das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der braune Rückstand von 1.5 g enthält 110 mg Trehalose (7 Gew.-%).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Lösungen, bei welchem die Anreicherung mit Hilfe eines Adsorbens erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Alumosilicat ist.  
5
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Alumosilicat ein Zeolith ist.
- 10 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Trehalose an das Alumosilicat adsorbiert wird.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Zeolith ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus FAU, BEA, DON, EMT, CFI,  
15 MOR, MAZ, und OFF.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens im Verlauf eines chromatographischen Verfahrens eingesetzt wird.
- 20 6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung aus einer enzymatischen Trehalose-Synthese stammt.
7. Verfahren zur Anreicherung von Trehalose aus Fermentationsbrühen, enthaltend die Schritte Abtrennen von Feststoffen und Anreicherung der Trehalose mit Hilfe eines  
25 Adsorbens, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Alumosilicat ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Alumosilicat ein Zeolith ist.
- 30 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass aus der Fermentationsbrühe mindestens ein weiteres Wertprodukt außer Trehalose abgetrennt wird.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentationsbrühe aus einer Fermentation mit mindestens einem Mikroorganismus  
35 aus der Gruppe bestehend aus Saccharomyces spec., Candida spec., Escherichia coli, Corynebacterium spec., Corynebacterium glutamicum, Pseudomonas spec., Nocardia

spec., Brevibacterium spec., Arthrobacter spec., Stereomyces spec., Microbacterium spec., Aspergillus spec., Bacillus spec., Pichia spec. und Filobasidium spec. stammt.

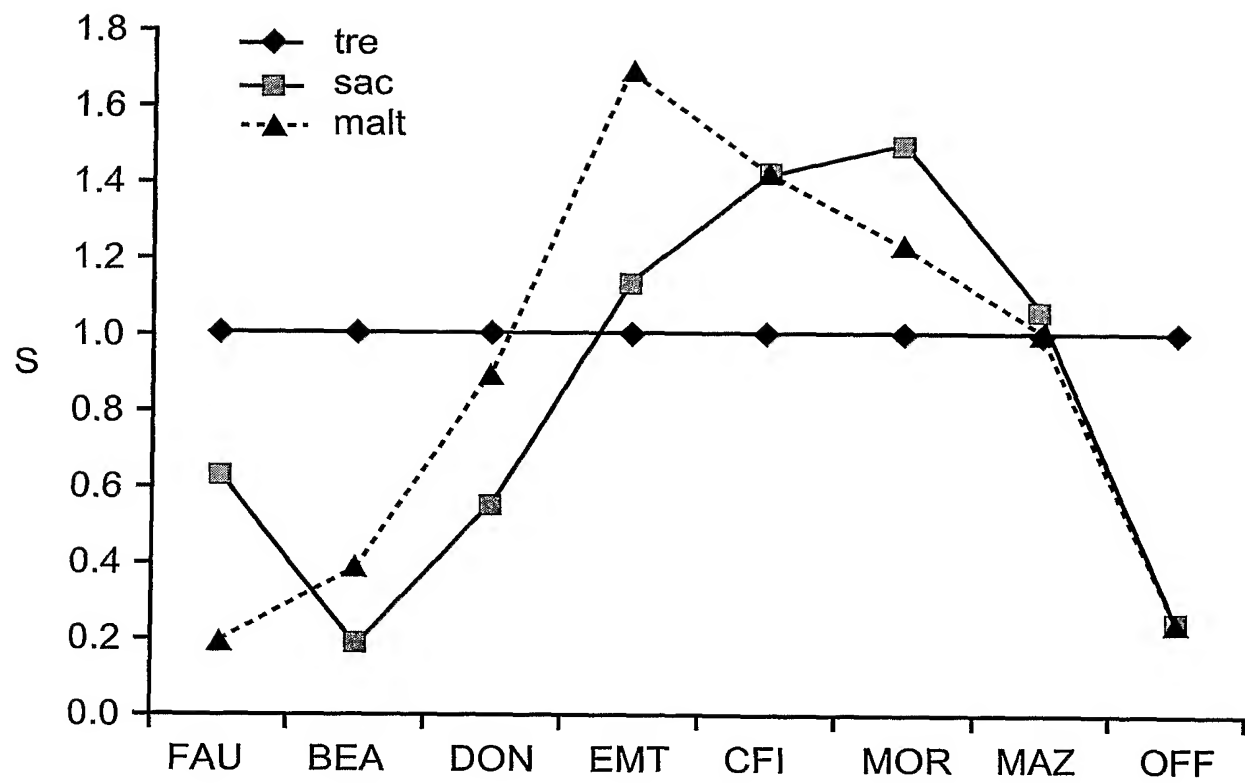
- 5 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Trehalose in der Fermentationsbrühe in einer Konzentration von weniger als 15 Gewichtsprozent gemessen am Trockengewicht der Fermentationsbrühe vorliegt.
- 10 12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren mindestens einen weiteren Schritt aus der Gruppe bestehend aus Aktivkohlebehandlung, Ultrafiltration, und Ionenaustauscherbehandlung umfasst.

15

20

FIG.1

1/3



2/3

FIG.2

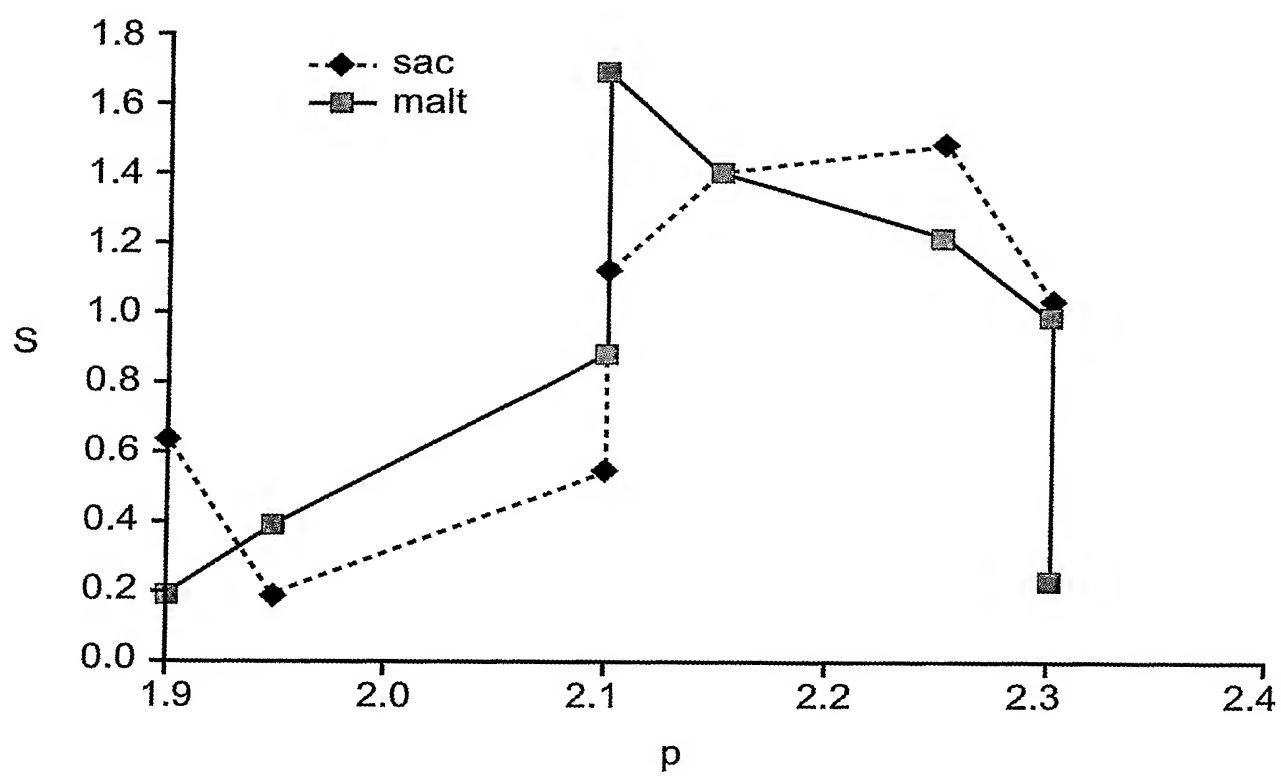
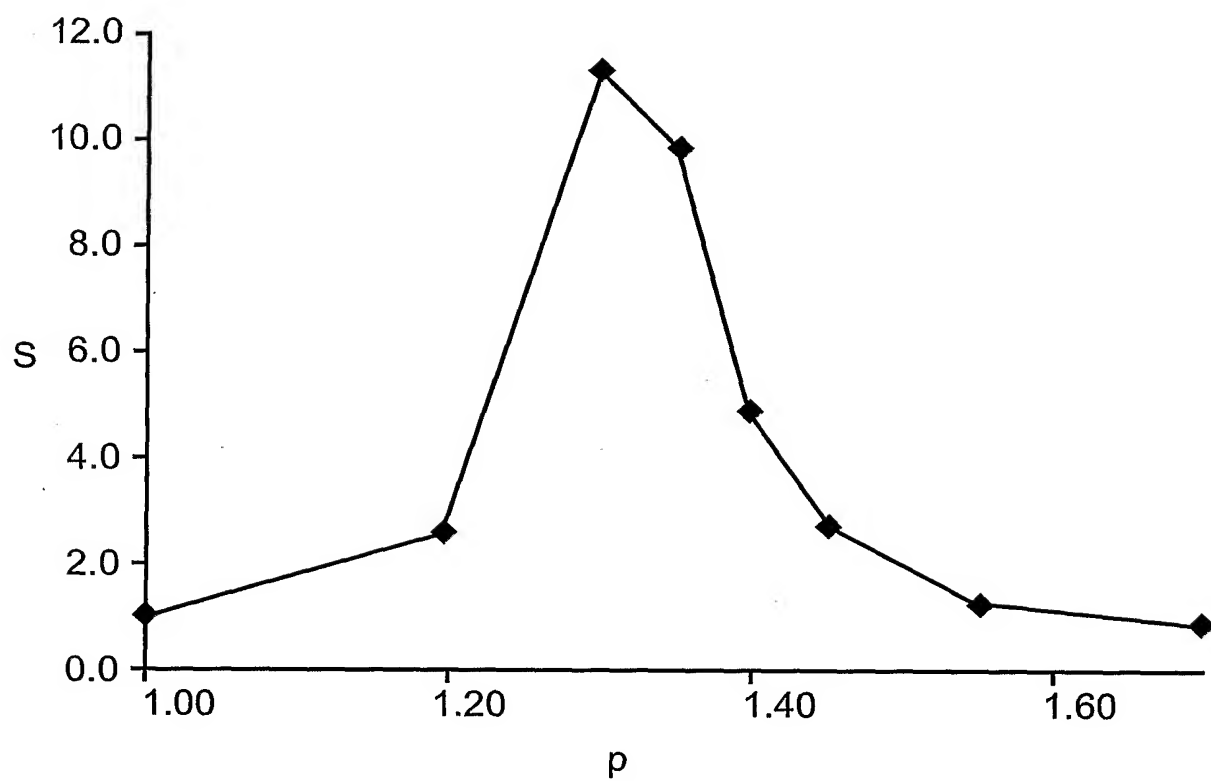


FIG.3

3/3





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002936

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; "Preparation of trehalose from fermented waste" XP002337484 Database accession no. 136:199338 abstract & CN 1 309 131 A (INST OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; INST. OF MICROBIOLO) 22 August 2001 (2001-08-22)	1,2,4-12
A	EP 0 625 578 A (SUEDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT) 23 November 1994 (1994-11-23) page 4, line 49 - page 4, line 51; example 5 ----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \*Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 2005

Date of mailing of the international search report

10/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002936

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 196 14 609 A1 (EPISUCRES S.A., ERSTEIN, FR) 16 October 1997 (1997-10-16) -----	
A	EP 0 636 693 A (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 1 February 1995 (1995-02-01) page 10, line 55 - page 11, line 2 -----	
A	EP 0 919 564 A (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 2 June 1999 (1999-06-02) -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2005/002936

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 1309131	A	22-08-2001	NONE	
EP 0625578	A	23-11-1994	AT 140032 T	15-07-1996
			AU 666073 B2	25-01-1996
			AU 6194094 A	10-11-1994
			DE 9321600 U1	06-04-2000
			DE 59303142 D1	08-08-1996
			DK 625578 T3	11-11-1996
			EP 0625578 A1	23-11-1994
			ES 2089691 T3	01-10-1996
			GR 3020742 T3	30-11-1996
			IL 109569 A	10-03-1998
			JP 7051079 A	28-02-1995
			US 5578339 A	26-11-1996
DE 19614609	A1	16-10-1997	NONE	
EP 0636693	A	01-02-1995	JP 3633648 B2	30-03-2005
			JP 7170977 A	11-07-1995
			AU 676326 B2	06-03-1997
			AU 6756994 A	02-02-1995
			CA 2128372 A1	21-01-1995
			CN 1106065 A	02-08-1995
			EP 1085096 A2	21-03-2001
			EP 0636693 A2	01-02-1995
			IL 110334 A	27-12-1998
			IL 120221 A	06-12-1998
			IL 121945 A	01-06-2000
			IL 127522 A	22-12-1999
			JP 2004313204 A	11-11-2004
			TW 414807 B	11-12-2000
			US 5538883 A	23-07-1996
			US 5736380 A	07-04-1998
			US 5965411 A	12-10-1999
			US 6090792 A	18-07-2000
EP 0919564	A	02-06-1999	JP 11116588 A	27-04-1999
			DE 69815476 D1	17-07-2003
			DE 69815476 T2	06-05-2004
			EP 0919564 A2	02-06-1999
			TW 526083 B	01-04-2003
			US 6200783 B1	13-03-2001

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07H3/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; "Preparation of trehalose from fermented waste" XP002337484 Database accession no. 136:199338 Zusammenfassung & CN 1 309 131 A (INST OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; INST. OF MICROBIOLO) 22. August 2001 (2001-08-22)	1, 2, 4-12
A	EP 0 625 578 A (SUEDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT) 23. November 1994 (1994-11-23) Seite 4, Zeile 49 - Seite 4, Zeile 51; Beispiel 5	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Juli 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/08/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardili, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 196 14 609 A1 (EPISUCRES S.A., ERSTEIN, FR) 16. Oktober 1997 (1997-10-16) -----	
A	EP 0 636 693 A (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 1. Februar 1995 (1995-02-01) Seite 10, Zeile 55 - Seite 11, Zeile 2 -----	
A	EP 0 919 564 A (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 2. Juni 1999 (1999-06-02) -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002936

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CN 1309131	A	22-08-2001	KEINE	
EP 0625578	A	23-11-1994	AT 140032 T	15-07-1996
			AU 666073 B2	25-01-1996
			AU 6194094 A	10-11-1994
			DE 9321600 U1	06-04-2000
			DE 59303142 D1	08-08-1996
			DK 625578 T3	11-11-1996
			EP 0625578 A1	23-11-1994
			ES 2089691 T3	01-10-1996
			GR 3020742 T3	30-11-1996
			IL 109569 A	10-03-1998
			JP 7051079 A	28-02-1995
			US 5578339 A	26-11-1996
DE 19614609	A1	16-10-1997	KEINE	
EP 0636693	A	01-02-1995	JP 3633648 B2	30-03-2005
			JP 7170977 A	11-07-1995
			AU 676326 B2	06-03-1997
			AU 6756994 A	02-02-1995
			CA 2128372 A1	21-01-1995
			CN 1106065 A	02-08-1995
			EP 1085096 A2	21-03-2001
			EP 0636693 A2	01-02-1995
			IL 110334 A	27-12-1998
			IL 120221 A	06-12-1998
			IL 121945 A	01-06-2000
			IL 127522 A	22-12-1999
			JP 2004313204 A	11-11-2004
			TW 414807 B	11-12-2000
			US 5538883 A	23-07-1996
			US 5736380 A	07-04-1998
			US 5965411 A	12-10-1999
			US 6090792 A	18-07-2000
EP 0919564	A	02-06-1999	JP 11116588 A	27-04-1999
			DE 69815476 D1	17-07-2003
			DE 69815476 T2	06-05-2004
			EP 0919564 A2	02-06-1999
			TW 526083 B	01-04-2003
			US 6200783 B1	13-03-2001